



Docket No.: 027944.102-US00
(PATENT)

(6)
Priority
8/13/02
DS

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Patent Application of:
Shinichi Kobori, et al.

Application No.: 10/067,502

Group Art Unit: N/A

Filed: February 7, 2002

Examiner: Not Yet Assigned

For: METHOD FOR SURFACE TREATMENT OF
GOLD-PLATED BODY AND SURFACE-
TREATED PRODUCT, AND PROCESS FOR
PRODUCING GOLD-PLATED BODY AND
GOLD-PLATED BODY, AND METHOD FOR
IMMOBILIZATION OF SULFUR-
CONTAINING MOLECULES

CLAIM FOR PRIORITY AND SUBMISSION OF DOCUMENTS

Commissioner for Patents
Washington, DC 20231

Dear Sir:

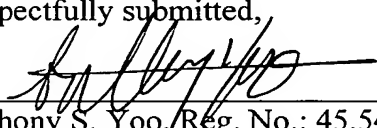
Applicant hereby claims priority under 35 U.S.C. 119 based on the following prior foreign applications filed in the following foreign countries on the dates indicated:

<u>Country</u>	<u>Application No.</u>	<u>Date</u>
Japan	2001-032735	February 8, 2001
Japan	2002-023914	January 31, 2002

In support of this claim, a certified copy of each said original foreign application is filed herewith.

Dated: May 24, 2002

Respectfully submitted,

By 
Anthony S. Yoo, Reg. No.: 45,540
COVINGTON & BURLING
1201 Pennsylvania Avenue, N.W.
Washington, DC 20004-2401
(202) 662-6000

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日
Date of Application: 2001年 2月 8日

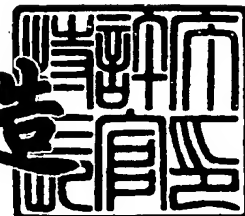
出 願 番 号
Application Number: 特願2001-032735
[ST.10/C]: [JP2001-032735]

出 願 人
Applicant(s): 京セラ株式会社
株式会社ティー・ユー・エム研究所

2002年 3月12日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2002-3016092

【書類名】 特許願

【整理番号】 T355Q3P002

【あて先】 特許庁長官殿

【発明者】

【住所又は居所】 東京都中央区八重洲 2 - 3 - 1 4 京セラ株式会社東京
八重洲事業所内

【氏名】 小堀 真一

【発明者】

【住所又は居所】 鹿児島県国分市山下町 1 - 1 京セラ株式会社鹿児島国
分工場内

【氏名】 中間 和浩

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県千葉市美浜区中瀬 2 - 6 株式会社ティー・ユー
・エム研究所内

【氏名】 宮原 浩嘉

【特許出願人】

【識別番号】 000006633

【住所又は居所】 京都府京都市伏見区竹田鳥羽殿町 6 番地

【氏名又は名称】 京セラ株式会社

【特許出願人】

【識別番号】 501005829

【住所又は居所】 千葉県千葉市美浜区中瀬 2 丁目 6 番

【氏名又は名称】 株式会社ティー・ユー・エム研究所

【代理人】

【識別番号】 100079108

【弁理士】

【氏名又は名称】 稲葉 良幸

【選任した代理人】

【識別番号】 100080953

【弁理士】

【氏名又は名称】 田中 克郎

【選任した代理人】

【識別番号】 100093861

【弁理士】

【氏名又は名称】 大賀 眞司

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 011903

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 金メッキ体の表面処理法、並びにこれを用いた表面処理物及び含硫黄分子の固定化法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 多数の含硫黄分子が固定化可能なように、金メッキ体の表面に、温度 3 5 0 ～ 7 9 0℃でアニール化処理を施す、金メッキ体の表面処理法。

【請求項 2】 表面金結晶が (1 , 1 , 1) 面の配向面を 4 0 % 以上有する構造になるように処理する、請求項 1 記載の金メッキ体の表面処理法。

【請求項 3】 前記金メッキ体は、導電性基材を金メッキ溶液に浸漬し、該導電性基材及び該金メッキ溶液に電流を流して得られた電気メッキ体である請求項 1 又は 2 記載の金メッキ法。

【請求項 4】 前記含硫黄分子が、核酸残基、蛋白質残基又は蛋白質結合性基を含む請求項 1 ～ 3 の何れかに記載の金メッキ体の表面処理法。

【請求項 5】 前記含硫黄分子が、塩基配列が未確認の遺伝子を検出するためのプローブである請求項 1 ～ 3 の何れかに記載の金メッキ体の表面処理法。

【請求項 6】 請求項 1 ～ 5 の何れかに記載の表面処理法により処理された金メッキ体の表面処理物。

【請求項 7】 表面金結晶が (1 , 1 , 1) 面の配向面を 4 0 % 以上有する構造である請求項 6 記載の表面処理物。

【請求項 8】 請求項 1 ～ 5 の何れかに記載の表面処理法により処理した金メッキ体の表面処理物に、多数の含硫黄分子を固定化する、含硫黄分子の固定化法。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

【発明の属する技術分野】

本発明は、多量の含硫黄分子の固定化を可能にする、金メッキ体の表面処理法及び表面処理物並びに固定化法に関する。

【 0 0 0 2 】

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】

従来から、例えば、遺伝子検出におけるプローブ（目的遺伝子の探索子）の固定化や、レジスト（感光剤）等としての自己組織化膜（SAM）の固定化等、種々の分野において、金（Au）の表面に、S-H基、S-S基等を有する含硫黄分子を固定化する技術が知られている（S-H基と金の結合については、J. Am. Chem. Soc. 111号P321～ 1989年 C. D. Bain著や、Anal. Chem. 70号P2396～1998年 J. J. Gooding著等参照）。

【0003】

このような含硫黄分子の固定担体となる金としては、合金等の基材の表面に、通常公知のメッキ法により金をメッキ処理した金メッキ体等が使用されている。

しかし、このような金メッキ体では、その表面に少量の含硫黄分子しか固定化されないという問題があった。これは、金メッキ体表面の金結晶構造の配向が一定していないため、含硫黄分子が有するS-H基やS-S基等と金との結合（配位結合）反応量が低下することに起因すると考えられている。

【0004】

そこで、金メッキ体の表面構造の配向を一定化させ、多量の含硫黄分子を金メッキ体に固定化させるべく、金メッキ体を形成する過程における金メッキ処理の温度等の条件を適宜変更することが考えられるが、このような条件を変更することは實際上困難であった。

【0005】

従って、本発明の目的は、多量の含硫黄分子の固定化を可能にする、金メッキ体の表面処理法及び表面処理物並びに固定化法を提供することにある。

【0006】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、鋭意研究した結果、金メッキ処理後の金メッキ体の表面に、特定温度の範囲内でアニール化処理を施す方法が、前記目的を達成し得ることの知見を得た。

【0007】

本発明は、前記知見に基づきなされたもので、多数の含硫黄分子が固定化可能なように、金メッキ体の表面に、温度350～790℃でアニール化処理を施す

、金メッキ体の表面処理法を提供するものである。

【0008】

また、本発明は、前記表面処理法により処理された金メッキ体の表面処理物を提供するものである。

【0009】

また、本発明は、前記表面処理法により処理した金メッキ体の表面処理物に、多数の含硫黄分子を固定化する、含硫黄分子の固定化法を提供するものである。

【0010】

【発明の実施の形態】

以下、本発明の金メッキ体の表面処理法を、その好ましい実施形態に基づいて詳細に説明する。

【0011】

本発明の表面処理法は、多数の含硫黄分子が固定化可能なように（好ましくは、S-H基又はS-S基を有する多数の含硫黄分子が該S-H基又はS-S基を介して固定化可能なように）、金メッキ体の表面に、温度350～790℃でアニール化処理を施す方法である。かかる範囲内の温度でアニール化処理することにより、前記含硫黄分子が多数固定化できる表面処理物が得られる。

【0012】

本発明において、アニール化処理は、J I S K 6900に準拠して行う。

【0013】

アニール化処理の温度は、前述の通り350～790℃であるが、ここでいう温度は、ピーク温度（最高値）をいう。具体的には、アニール化処理を、室温（通常10～30℃）の初期温度から昇温速度5～30℃/min. で昇温しながら行い、ピーク温度である前記温度となったときに昇温を止め、その後定温状態で行う。

【0014】

アニール化処理の温度が350℃未満では、前記含硫黄分子の金メッキ体表面への固定化量が不十分となる。一方、アニール化処理の温度が790℃を超えると、例えば、基材をAgろう（共晶Ag-Cu）で支持体に立着して使用する場

合にその Ag ろうが再溶解して基材が倒れる現象が起こる等、金メッキ体を構成する基材やその基材の周辺部材が溶解する等の問題が生じる。

特に、前記含硫黄分子の固定化量の増量、及び基材とその周辺部材への悪影響防止の点から、アニール化処理の温度は、450～700℃が好ましい。

【0015】

アニール化処理の処理時間は、前記範囲内の処理温度に応じて適宜調整されるが、一般には、30～600分の範囲内で処理を行う。

特に、350～600℃の処理は、30～240分間行うのが好ましい。

また、600～790℃の処理は、60～240分間行うのが好ましい。

【0016】

また、アニール化処理は、通常、還元ガス（水素と窒素の混合ガス）の存在下で行うが、特に制限されず、水素100%下、窒素100%下、又は真空下で行ってもよい。

【0017】

特に、アニール化処理は、得られる表面処理物の表面金結晶が（1，1，1）面の配向面を40%以上、特に60%以上有する構造になるように処理することが好ましい。この（1，1，1）面は金原子の最密パッキング構造であり、特定含有量以上の（1，1，1）面を有する結晶構造を表面に有することで、配向が一定となり、含硫黄分子が有するS-H基やS-S基等との結合部位も一定数確保され则认为られる。

尚、（1，1，1）面の含有率の測定法は、後述の実施例で示す通りである。

【0018】

本発明の表面処理法において、アニール化処理の対象である金メッキ体としては、特に制限されず、種々の基材の表面を種々の公知のメッキ法〔例えば、電気メッキ法、化学（無電解）メッキ法等〕によってメッキしたものが使用される。

【0019】

本発明においては、金メッキ体として、特に、コバルト、ニッケル、鉄等を含む合金等かなる導電性基材を必要に応じて下地処理した後に金メッキ溶液に浸漬し、該導電性基材及び該金メッキ溶液に電流を流して得られた電気メッキ体を使

用することが好ましい。とりわけ、特定の配列を有するDNA、RNA等の遺伝子の電気化学的検出方法に適用する検出チップの電極としてのピン等の用途に使用される電気メッキ体が好ましい。この検出チップのピンの場合には、遺伝子にS-H基やS-S基等を導入して固定化する面、即ちピンの先端をアニール化処理する。

【0020】

本発明の表面処理法により得られる金メッキ体の表面処理物に固定化させる含硫黄分子としては、S-H基やS-S基を有する含硫黄分子の他、金表面に固定し得る全ての含硫黄分子が挙げられる。

【0021】

本発明においては、前記含硫黄分子として、特に、核酸残基、蛋白質残基又は蛋白質結合性基を含むものが好ましい。

核酸残基を含む含硫黄分子としては、DNA、RNA等の核酸にS-H基やS-S基等を導入したもの等が挙げられる。

また、蛋白質残基を含む含硫黄分子としては、蛋白質にS-H基やS-S基等を導入したものや、S原子を分子内に有する蛋白質そのもの等が挙げられる。

また、蛋白質結合性基を含む含硫黄化合物は、S-H基やS-S基等を有する化合物に、リンカー等によりカルボキシル基やアミド基等の蛋白質結合性基をもたせたもので、金メッキ体表面にSAM（自己組織化単分子膜）を形成して固定化し得るもの等が挙げられる。蛋白質結合性基を含む含硫黄化合物の具体例としては、4, 4'-ジチオジブチル酸〔4, 4'-Dithio Dibutyric Acid (DDA)〕等が挙げられる。このような蛋白質結合性基を含む含硫黄化合物を固定化させた後、該蛋白質結合性基に、蛋白質を結合させることにより、プロテインチップ等として利用することが可能となる。例えば、蛋白質結合性基を含む含硫黄化合物としてDDAを使用する場合には、分子内に有するS-S基を介してDDAを金メッキ体表面にSAMの単分子膜を形成させて固定化した後、固定化されたDDA末端の蛋白質結合性基としてのカルボキシル基をEDA（水溶性カルボジイミド）やNHS（N-ヒドロキシコハク酸イミド）等で活性化させ、これに蛋白質を結合させる。

【0022】

また、本発明においては、前記含硫黄分子として、塩基配列が未確認の遺伝子（目的遺伝子）を検出するためのプローブ（好ましくはS-H基又はS-S基を導入したもの）であることも好ましい。ここで、プローブとは、目的遺伝子を探索する探索子の意味である。プローブとしては、目的遺伝子と相補的な塩基対部分を有する遺伝子が用いられ、具体的には、同一の又は異なる遺伝子配列を有する複数のPCR産物、オリゴヌクレオチド、mRNA、cDNA、PNA（peptidic nucleic acid）、又はLNA（locked nucleic acid；Proligo LLC社商標）等が用いられる。

【0023】

本発明の表面処理法においては、このようなプローブもS-H基やS-S基等を介して金メッキ体の表面に多数固定化させるように処理するため、得られる表面処理物への固定化プローブが増加し、延いては検出可能となる塩基配列が未確認の遺伝子の数を増加させることができる。

【0024】

本発明によれば、前述した表面処理法により処理された金メッキ体の表面処理物を提供することができる。かかる金メッキ体の表面処理物は、前述した多数の含硫黄分子（好ましくはS-H基又はS-S基を有する多数の含硫黄分子）を固定化することができる。

本発明の表面処理物は、その表面金結晶が（1，1，1）面の配向面を通常、40%以上有する構造のものである。このような構造を表面に有する本発明の表面処理物は、より多くの前記含硫黄分子を固定化することができる。

【0025】

また、本発明によれば、前述した表面処理法により処理した金メッキ体の表面処理物に、多数の含硫黄分子（好ましくはS-H基又はS-S基を有する多数の含硫黄分子）を固定化する方法（含硫黄分子の固定化法）を提供することができる。かかる固定化法によれば、従来可能でなかった量の前記硫黄分子の金メッキ体への固定化を可能とする。尚、固定化量の測定法は、後述の実施例で示す通りである。

【 0 0 2 6 】

【実施例】

以下、実施例及び比較例を挙げて、本発明を更に詳細に説明する。しかしながら、本発明はこれらの実施例に何等限定されるものではない。

【実施例 1】

(金メッキ体の作製)

C o - N i - F e 合金からなる複数の導電性材料の周囲を N i で下地処理した、N i 層を有する複数の導電性基材（遺伝子検出チップ用ピン）を用い、これをシアン系金メッキ液に浸漬し、基材と金メッキ液にメッキ電流密度 0.25 A/dm^2 の電流を通じて、厚さ $2.0 \sim 3.0 \mu\text{m}$ の金表面層を有する金メッキ体を得た。

【 0 0 2 7 】

(アニール化处理)

得られた金メッキ体の表面に、還元ガス ($\text{H}_2 : \text{N}_2 = 15 : 85$) 雰囲気下にて、温度 450°C でアニール化处理を施した。具体的には、アニール化处理を、室温 (25°C) の初期温度から昇温速度 19°C/min. で昇温しながら行い、ピーク温度 450°C となったときに昇温を止め、その後定温状態で行った。この際、 400°C 以上の処理を約 20 分間行なった。

【 0 0 2 8 】

((1, 1, 1) 面の含有率)

金メッキ体の表面の金結晶構造における配向面のうち、(1, 1, 1) 面の含有率 (%) を X 線回折測定により次のようにして算出した。その結果を下記結果欄に示す。

X 線回折測定は、リガク製 R I N T 1 4 0 0 V 型により通常測定 ($2\theta = 10 \sim 100^\circ$ 、 $\text{CuK}\alpha$) で行なった。金結晶構造の配向性は、金の X 線回折パターンのピーク強度比により定性的に確認することができる。標準となる金粉末（配向なし）のピーク強度比と金メッキのピーク強度比とを比較し、あるピーク強度比が大きくなっていれば、その面に配向していると考えられる。一般に、(1, 1, 1)、(2, 2, 2)、(1, 0, 0)、(2, 0, 0) 等の面のピークは

、他の面と比べて配向し易い傾向がある。このため、本実施例では、あまり配向の影響を受けにくいと考えられる(3, 1, 1)のピーク強度を基準となるピークとし、その他のピーク強度比を算出した。そして、それぞれのピーク強度比から、各配向面の含有率(%)を算出した。尚、下記には、(1, 1, 1)面の含有率(%)のみ示す。

【0029】

(固定化法)

固定化に際しては、予め前処理〔アニール化処理した金メッキ体を、その周囲に形成される酸化被膜を除去するために、2M NaOH中で1hr煮沸した後、1.42濃硝酸で30min攪拌、超純水(mill-Q水)で充分洗浄〕してから行った。

2 pmol/ μ LのS-H基を有するプローブとしてのHS-P72〔p53遺伝子のコドン72 SNPS(P)、配列構造; HS-(5') AGG CTC G CTC CCC CCG TGG CC〕水溶液1 μ Lを、表面処理した金メッキ体としての複数のピン上にディップ(dip)し、それぞれの金メッキ体の表面に多数の分子を固定化させた(オーバーナイト、室温)。各ピンへのプローブの固定化の際は、乾燥を防止するため、それぞれのピンがウエット(wet)パット内になるようにすると共に、それら複数のピン全体がウエットパット内になるようにして行った。

【0030】

(固定化量)

固定化量の算出の前に、予め固定化後の表面処理金メッキ体(ピン)について、Au-S結合で固定化された分子以外の残存したHS-P72非特異吸着種を除去した。その後、固定化した表面処理金メッキ体(ピン)を、下記組成の電解液に5分間浸漬させた。

電解液組成: 50 μ M FND (Ferrocenylnaphthalene diimide; フェロセン化ナフタレンジイミド誘導体)

0.1M 酢酸バッファ (pH 5.6)

0.1M KCl

この際、静電的相互作用（カチオニックなFNDがアニオニックな固定化プローブポリリン酸部に静電的に濃縮する作用）と疎水的相互作用（FNDのナフタレンジイミド部と固定化プローブの塩基との間の疎水性相互作用）により、FNDが固定化プローブに濃縮される。この濃縮FND量を、FND両末端に連結させた電気化学活性種フェロセンのDPV（ディファレンシャルパルスボルタモグラフィー）による酸化電流値により定量し、これをプローブ固定化量として算出した。即ち、表面処理金メッキ体としてのピンの表面への分子の固定化量（ピン1本当たり）を電流値（ μA ）として求めた。その結果を下記結果欄に示す。尚、この電流値が大きいほど固定化量が多いことを示し、電流値が小さいほど固定化量が少ないことを示す。

【0031】

〔実施例2〕

温度700℃でアニール化処理した以外は、実施例1と同様にして、金メッキ体の表面処理物を得た。アニール化処理については、室温（25℃）の初期温度から昇温速度19℃/min. で昇温しながら行い、ピーク温度700℃となったときに昇温を止め、その後定温状態で行った。この際、600℃以上の処理を約40分間行った。

得られた金メッキ体の表面処理物について、実施例1と同様にして、（1，1，1）面の含有率（%）及び固定化量（ μA ）を算出した。その結果を下記結果欄に示す。

【0032】

〔実施例3〕

金メッキ溶液中にタリウム系結晶成長剤（硫酸タリウム； Tl_2SO_4 ）を0.002g/l（2ppm）添加した以外は、実施例2と同様にして、金メッキ体の表面処理物を得た。

得られた金メッキ体の表面処理物について、実施例1と同様にして、（1，1，1）面の含有率（%）及び固定化量（ μA ）を算出した。その結果を下記結果欄に示す。

【0033】

〔比較例 1〕

実施例 1 と同様にして金メッキ体を得た後、アニール化処理を行わず、その金メッキ体をそのまま使用した。これについて実施例 1 と同様にして、(1, 1, 1) 面の含有率 (%) 及び固定化量 (μ A) を算出した。その結果を下記結果欄に示す。

【0034】

〔結果欄〕

	(1,1,1)面の含有率 (%)	固定化量 (μ
A)		
実施例 1		
(450℃アニール化)	68.0	1.433
実施例 2		
(700℃アニール化)	78.7	1.465
実施例 3		
(メッキ添加剤+700℃アニール化)	82.5	2.059
比較例 1		
(アニール化なし)	13.3	0.798

【0035】

以上の結果から明らかなように、金メッキ体の表面に特定範囲の温度でアニール化処理する本発明の表面処理法（実施例 1～3）では、アニール化処理しない比較例 1 の場合に比して、得られる金メッキ体表面処理物の金結晶構造における (1, 1, 1) 面の含有率が高く、また含硫黄分子の金表面への固定化量も多いことが判る。

【0036】

【発明の効果】

本発明によれば、多量の含硫黄分子の固定化を可能にする、金メッキ体の表面処理方法及び表面処理物並びに含硫黄分子の固定化法が提供される。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 多量の含硫黄分子の固定化を可能にする金メッキ体の表面処理方法及び表面処理物並びに含硫黄分子の固定化法を提供すること。

【解決手段】 本発明の表面処理方法は、多数の含硫黄分子が固定化可能なように、金メッキ体の表面に、温度 3 5 0 ～ 7 9 0 ℃ でアニール化処理を施すものである。特に、表面金結晶が (1 , 1 , 1) 面の配向面を 4 0 % 以上有する構造になるように処理するものである。

【選択図】 なし

特2001-032735

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2001-032735
受付番号	50100180150
書類名	特許願
担当官	第三担当上席 0092
作成日	平成13年 2月 9日

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成13年 2月 8日

次頁無

特 2001-032735

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2001-032735
受付番号	50100180150
書類名	特許願
担当官	小菅 博 2143
作成日	平成13年12月 3日

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成13年 2月 8日

次頁無

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000006633]

1. 変更年月日 1998年 8月21日

[変更理由] 住所変更

住 所 京都府京都市伏見区竹田鳥羽殿町6番地

氏 名 京セラ株式会社

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [501005829]

1. 変更年月日 2000年12月28日
[変更理由] 新規登録
住 所 千葉県千葉市美浜区中瀬2丁目6番
氏 名 株式会社ティー・ユー・エム研究所